

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-155180

(43)Date of publication of application : 20.06.1995

(51)Int.Cl.

C12N 9/16  
C12N 1/20  
// (C12N 9/16  
C12R 1:38 )  
(C12N 1/20  
C12R 1:38 )

(21)Application number : 05-339196

(71)Applicant : SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

(22)Date of filing : 06.12.1993

(72)Inventor : TOYODA SHUJI  
AKAI YOSHIHITO  
KAZUNO KIMIMASA  
IIDA MITSUGI

**(54) NEW PHB DEGRADING ENZYME, ITS PRODUCTION AND MICROORGANISM CAPABLE OF PRODUCING THE SAME ENZYME****(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain a new PHB degrading enzyme useful for degrading a biodegradable plastics containing polyhydroxybutyrate as a component.

**CONSTITUTION:** This polyhydroxybutyrate degrading enzyme is capable of manifesting the following properties: (1) action: degrading the polyhydroxybutyrate; (2) optimum pH: about 4.3; (3) isoelectric point: about 8.4; (4) optimum temperature: about 40° C and (5) molecular weight: about 513000 daltons (measured by a gel filtration method) and about 42700 daltons [measured by a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)]. This enzyme is capable of carrying out the degrading treatment of the PHB in a short time without producing noxious by-products. The enzyme can be collected from a culture medium or a microbial cell by culturing *Pseudomonas* sp. 328 strain (FERM P-13954), etc.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 24.02.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 19.11.2003

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-155180

(43) 公開日 平成7年(1995)6月20日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/16	Z	8827-4B		
1/20	A	8828-4B		
// (C 1 2 N 9/16				
C 1 2 R 1:38)				
(C 1 2 N 1/20				

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全 4 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平5-339196

(22) 出願日 平成5年(1993)12月6日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成5年11月10日  
(社) 日本生物工学会発行の「平成5年度 日本生物工  
学会大会 講演要旨集」に発表

(71) 出願人 000006699

雪印乳業株式会社

北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

(72) 発明者 豊田 修次

北海道札幌市東区苗穂町1丁目1-3

(72) 発明者 赤井 義仁

埼玉県川越市新宿町5-11-3 雪印乳業  
独身寮

(72) 発明者 数野 公正

千葉県流山市美原1-1224 流山ハイツ2  
-203

(72) 発明者 飯田 貢

神奈川県横須賀市二葉1-41-7

(74) 代理人 弁理士 藤野 清也

(54) 【発明の名称】 新規PHB分解酵素、その製造法及び該酵素を産生する微生物

(57) 【要約】

【構成】 シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物の産生するポリヒドロキシブチレート分解酵素。その製造法及びこの酵素を産生するシュードモナス属 sp. 328 株 (FERM P-13954)。上記微生物は、東京都新宿区の土壤中より分離された。

【効果】 生分解性プラスチックのポリヒドロキシブチレートを短時間のうちに効率よく生分解することができ、環境保護に有用である。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の性質を示すポリヒドロキシブチレート分解酵素。

- (1) 作用：ポリヒドロキシブチレートを分解する。
- (2) 至適 pH：約 4.3
- (3) 等電点：約 8.4
- (4) 最適温度：約 40℃
- (5) 分子量：約 513,000 ダルトン (ゲル濾過)

約 42,700 ダルトン (SDS-PAGE)

【請求項2】 シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物に由来する請求項1記載の酵素。

【請求項3】 微生物がシュードモナス (*Pseudomonas*) sp. 328 株 (FERM P-13954) である請求項2記載の酵素。

【請求項4】 シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属し、請求項1記載のポリヒドロキシブチレート分解酵素産生能を有する微生物を培養し、培地または菌体に該酵素を産生せしめ、これを採取することを特徴とするポリヒドロキシブチレート分解酵素の製造法。

【請求項5】 微生物がシュードモナス (*Pseudomonas*) sp. 328 株 (FERM P-13954) である請求項4記載の製造法。

【請求項6】 シュードモナス (*Pseudomonas*) sp. 328 株 (FERM P-13954)。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なポリヒドロキシブチレート分解酵素 (ポリヒドロキシブチレートデポリメラーゼ) に関する。また、本発明は、シュードモナス属に属する微生物から新規なポリヒドロキシブチレート分解酵素を製造する方法に関する。さらに、本発明は、新規なポリヒドロキシブチレート分解酵素を産生するシュードモナス属に属する微生物に関する。本発明では、このポリヒドロキシブチレート分解酵素、あるいは、このポリヒドロキシブチレート分解酵素を産生するシュードモナス属に属する微生物を用いることにより、ポリヒドロキシブチレートを成分とする生分解性プラスチックを効率的に分解することが可能である。

## 【0002】

【従来の技術】 近年、生分解性プラスチック製品は、土中に投棄した後に埋め立てまたは海中投棄などの処理方法によって自然界の微生物に分解され得る素材として、他のプラスチック素材製品よりも高価であるにもかかわらず、これらの素材に代わる物として使用が増加してきている。しかし、現在のプラスチックごみの発生量を考慮すると、仮に全てのプラスチック製品が生分解性プラスチックになったとしても、これを処理するのに自然界の微生物の働きによる分解を待っているだけでは処理しきれなくなることが予想される。そこで、微生物による分解を促進するために生分解性プラスチック素材に微生物培地成分を配合する方法 (特開平4-168150号公報)、生分解性プラスチック素材にリパー

ゼ、アミラーゼ、セルラーゼ、乳酸脱水素酵素などの加水分解酵素を添加する方法 (特開平4-168149号公報)、生分解性プラスチック素材成形品を製造する際に配合する無機及び/または有機フィラーの配合量と平均体積を特定範囲に調節し、成形品使用中の生分解及び崩壊を抑制する方法 (特開平4-146953号公報) などが提案されている。しかしながら、ポリヒドロキシブチレート (以下、PHBと略記する) を主な素材とする生分解性プラスチックを特異的に分解する PHB 分解酵素、あるいはその PHB 分解酵素を菌体外に産生する微生物については、実用化されていない現状にある。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者らは、このような状況を鑑み鋭意研究を行った結果、東京都新宿区の土壌より分離したシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物が、PHB を特異的に分解する PHB 分解酵素を産生することを見出した。さらに、こうして得られた菌株からこの PHB 分解酵素を分離、精製して本発明を完成するに至った。したがって、本発明は、生分解性プラスチックの PHB を分解する PHB 分解酵素を提供することを課題とする。また、本発明は、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物を培養して PHB 分解酵素を採取する方法を提供することを課題とする。さらに、本発明は、PHB 分解酵素を産生するシュードモナス (*Pseudomonas*) 属に属する微生物を提供することを課題とする。

## 【0004】

【課題を解決する手段】 本発明は、上記課題を解決するためになされたものである。本発明の PHB を特異的に分解する酵素を産生する微生物は、前記のように東京都新宿区の土壌から分離された。この微生物の分離方法については後に記述する。ここで本発明の PHB 分解酵素を産生する微生物の分類学的性状及び生理学的性状を以下に示す。

(1) 菌形	桿菌
(2) サイズ	1.0 × 1.5 μm
(3) 連鎖	—
(4) 運動性	+
(5) グラム染色性	+
(6) 好気性	+
(7) オキシダーゼテスト	+
(8) カタラーゼテスト	+
(9) DNase	—
(10) DNA中のGC含量	63.9 %

+はありを、—はなしを示す。この結果、Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986) に基づいて、この微生物菌体をシュードモナス・スピーシーズと同定した。そして、この菌体、シュードモナス (*Pseudomonas*) sp. 328 株は SBT-3444 株として工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている (受託番号 FERM P-1395

4).

【0005】次に、本発明のPHB分解酵素を製造する方法について説明する。シュードモナス・スピーシーズをPHB添加培地、例えば、Succinate 培地[J.Bacteriol. 119, 152-161(1974)]のクエン酸の代わりにPHBを1%添加した培地に添加し、30℃前後で15-20時間培養した後、菌体を遠心分離で回収する。次に、その菌体をPHB分解酵素生産培地に添加し、30℃前後で菌数が $5 \times 10^8$  cells/ml程度になるまで培養してPHB分解酵素を産生させる。そして、その培養上清を回収して70%硫

安分画を行った後、この沈殿画分にPHBを添加して、PHBと本酵素の親和性を利用してPHB-酵素複合体を形成させ、遠心分離によってPHB分解酵素蛋白を回収する。さらに、このPHB分解酵素蛋白を種々のクロマトグラフィーにより精製し、SDS-PAGEで単一のPHB分解酵素を得ることができる。

【0006】このようにして得られるPHB分解酵素の性質は、以下の通りである。

- (1) 至適pH                      pH 約 4.3
- (2) 等電点                      pI 約 8.4
- (3) 最適温度                    約 40℃
- (4) 分子量                      約 513,000 ダルトン (ゲル濾過)

約 42,700ダルトン(SDS-PAGE)

【0007】次に実施例を挙げて、本発明をさらに詳しく説明する。

【実施例1】PHB分解酵素の土壌からの分離方法について説明する。すなわち、東京都新宿区から採取した土壌を生理食塩水で希釈し、この希釈液を遠心分離した上清を段階的に希釈して、表2に示したPHB分解酵素生産培地に寒天を1.5%添加して作成したプレートに塗抹\*

\*する。PHB分解酵素を生産する菌株は白濁したプレート上に透明なハローを形成することにより分離することができる。さらに、こうして得られた菌株をPHB分解酵素生産培地より培養し、PHB分解酵素を生産することを確認した。得られた菌株は、PHB添加培地に寒天を1.5%加えて作成したスラントで植え継ぎを行った。このようにして得られた菌株はPHB分解活性が著しく強力で、この菌株を同定したところ、前述のような菌学的性質を示し、シュードモナス(*Pseudomonas*) sp. 328株と命名し、生命工学工業技術研究所に寄託した(受託番号 FERM P-13954)。

【0008】

【実施例2】実施例1で得られたシュードモナス(*Pseudomonas*) sp. 328株(FERM P-13954)を表1に示すPHB添加培地に添加し、30℃で17時間培養した後、遠心分離で回収した菌体を表2に示すPHB分解酵素生産培地に添加し、30℃で菌数が $5 \times 10^8$  cells/mlとなるまで培養した。次に、遠心分離で培養上清を回収した後、70%硫安分画を行って、PHB分解酵素活性のある沈殿画分を回収した。そして、このPHB分解酵素画分にPHBを添加してPHB-酵素複合体を形成させ、10,000rpm 15分間の遠心分離により沈殿したPHB-酵素複合体を回収した。この操作を3回繰り返した。さらに、このPHB分解酵素蛋白をDEAE-TOYOPEARL(商品名) 650Mに10mM トリス+5% グリセロール(pH8.8)緩衝液を用いて吸着させ、0.08M NaClで洗浄後、0.18M NaClで溶出させた。以上の操作により、SDS-PAGEで単一のPHB分解酵素を得た。

【0009】以上の操作における精製度、および回収率を以下に示した。

操 作	活 性	蛋白量	比活性	回収率
培養上清	84.8	17.2	4.9	100
硫安分画	72.6	5.8	12.4	85.6
アフィニティー*	50.3	0.99	50.8	59.3
イオン交換クロマト	15.5	0.18	87.6	18.3

\* PHB-酵素複合体を作成させ、これを遠心分離により回収する方法を示した。単位はそれぞれ以下に示した。

活性 U/ml (1Uは、1分間に吸収波長650nmの吸光度が0.001減少する量)

※蛋白量 mg/ml  
比活性 U/mg  
回収率 %

【0010】

※ 【表1】

PHB添加培地

成 分	濃 度
PHB	1 %
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH=6.50)	33 mM

塩化アンモニウム	18	mM
硫酸マグネシウム・7水塩	2	mM
塩化鉄 (III)・6水塩	0.037	mM
塩化カルシウム	0.045	mM

【0011】

【表2】

PHB分解酵素生産培地

成 分	濃 度
PHB	1 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH=6.8)	33 mM
塩化アンモニウム	18 mM
硫酸マグネシウム・7水塩	1 mM

【0012】

\* ら0.283 に減少した。

【試験例1】実施例2で得られたPHB分解酵素について、PHB分解活性の有無を試験した。精製水 0.8ml、0.1M 酢酸緩衝液 1ml、10mg/ml濃度のPHB溶液40 $\mu$ l から成る反応液1.84mlに、実施例2で得られたPHB分解酵素液 200 $\mu$ l を添加し、30℃で20分間保持したところ、PHBに特異的な吸収波長 650nmの吸光度が1.0 か\*

【0013】

【発明の効果】本発明のPHB分解酵素、あるいは、本発明のPHB分解酵素を産生するシュードモナス属に属する微生物を用いることにより、有害な副産物を伴うことなく生分解性プラスチックのPHBを短時間で効率的に処理することができ、環境保護に有用である。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

C12R 1:38)